

Titolo divulgativo: L'importanza della ricerca di cellule tumorali nel sangue dei pazienti

Titolo scientifico: Isolamento e caratterizzazione di cellule tumorali circolanti vitali

Responsabile Scientifico del Progetto: **Prof.ssa Manuela Ferracin**. Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna

Gruppo di studio: Dott.ssa Irene Salamon, Dott.ssa Noemi Laprovitera, Dott.ssa Giulia Gallerani e Dott. Giorgio Durante (Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale); Dott.ssa Ivana Kurelac (Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche), Università di Bologna

RELAZIONE SCIENTIFICA

Introduzione

I tumori solidi maligni, se non vengono eliminati in fase precoce, sono destinati a diffondersi ai linfonodi e agli organi vicini e a dare origine a metastasi a distanza. Una diagnosi di cancro metastatico riduce considerevolmente le possibilità di eliminare il tumore e curare il paziente. Il processo metastatico è reso possibile dalla progressiva acquisizione di alterazioni genetiche da parte delle cellule tumorali, che alla fine diventano ancoraggio-indipendenti e autosufficienti per la crescita cellulare. Una fonte di cellule neoplastiche potenzialmente metastatiche è costituita dalle cellule tumorali circolanti (CTC).

Tali cellule possono distaccarsi da un tumore primario oppure da una metastasi, le quali, a loro volta, possono essere generate dalla migrazione di CTC in diversi tessuti seguendo la circolazione linfatica o ematica. In aggiunta, la loro presenza in circolo può essere dovuta alla sollecitazione di una massa tumorale, in seguito all'esecuzione di un intervento chirurgico volto alla sua rimozione.

Uno dei meccanismi molecolari responsabili dell'acquisizione della capacità delle cellule tumorali di distaccarsi dalla massa di origine e che ne favorisce l'ingresso delle cellule tumorali nel circolo è definito transizione epiteliale-mesenchimale (EMT); in particolare, si pensa che le cellule tumorali epiteliali perdano la capacità di adesione intercellulare e acquisiscano caratteristiche mesenchimali ed invasive, che consentono loro di disseminarsi nell'organismo, portando con sé le informazioni genetiche e molecolari del tumore primario. Nel sangue periferico, perciò, sarà possibile trovare alcune di queste cellule sfuggite dal tumore, le quali, insieme ad altri elementi di derivazione tumorale, come il DNA tumorale circolante (ctDNA), possono riflettere caratteristiche del tumore primario e delle sue metastasi. Per la valutazione e l'analisi delle CTC, è necessario eseguire quella che viene definita la biopsia liquida, ovvero un prelievo di sangue periferico minimamente invasivo in cui andare a ricercare, con opportune metodiche, la presenza di materiale di origine tumorale.

L'enumerazione delle CTC ci consente di eseguire una valutazione prognostica e una stima del rischio di recidiva e di metastasi, nonché un'analisi della risposta alle terapie in atto. I cambiamenti nel numero delle CTC, infatti, possono fungere da biomarcatore prognostico nel corso della progressione tumorale

È stato recentemente dimostrato che sia singole CTC che cluster di CTC o microemboli (CTM) sono altamente metastatici e che il loro numero nel sangue è correlato alla prognosi del paziente in diversi tipi tumorali. Le CTC dei pazienti sono state recentemente utilizzate per generare modelli

animali di xenotrapianti (CDX), che riflettono fedelmente la sensibilità del tumore ai trattamenti anticancro.

I pazienti con tumori metastatici possono avere un elevato numero di CTC nel sangue. Se correttamente isolate, le CTC possono essere mantenute vitali e essere impiegate per colture ex-vivo a lungo termine su cui effettuare test farmacologici o utilizzate per generare CDX paziente-specifici. In 1 ml di sangue, le CTC sono stimate tra 1 e 10, intersperse in 1 milione di globuli bianchi e miliardi di globuli rossi. Per il loro isolamento, sono state sviluppate diverse tecnologie basate sulla conoscenza dei marcatori delle CTC oppure sulle loro proprietà fisiche (dimensioni).

Per molti tipi tumorali non esistono ad oggi dei marcatori riconosciuti con cui isolare le CTC, come avviene per le CTC di origine epiteliale (CD45-, EpCAM + e citocheratine 8, 18+ e / o 19+). Pertanto, in questo progetto abbiamo sviluppato un protocollo per l'isolamento di CTC che fosse antigene-agnostico. Il nostro obiettivo è isolare tutti i cluster di CTC e CTC vitali in circolazione e stabilire colture ex vivo a lungo termine per test in vitro e sviluppo di modelli in vivo.

Per ottenere cellule tumorali vitali è possibile utilizzare un sistema acquisito proprio grazie al finanziamento della Fondazione del Monte (Parsortix, Angle), che seleziona e separa le cellule tumorali in circolo sulla base della maggiore dimensione rispetto alle cellule del sangue (leucociti, eritrociti) utilizzando un dispositivo che è già stato validato in pubblicazioni scientifiche di grande rilievo (<https://angleplc.com/library/publications/>).

Obiettivo di questo progetto è stato non solo quello di acquisire la strumentazione Parsortix ma anche di metterla a disposizione dei gruppi di ricerca che operano nell'area di Bologna-Forlì, attraverso la sua collocazione presso il centro per la ricerca biomedica applicata (CRBA) dell'Università di Bologna. I gruppi di ricerca proponenti hanno inoltre avviato diversi protocolli di utilizzo dello strumento.

Obiettivo 1: Isolamento e crescita di cellule tumorali circolanti vitali da tumori metastatici per l'esecuzione di test in-vitro

La strumentazione Parsortix è stata utilizzata per isolare cellule da pazienti con tumori metastatici di origine sconosciuta (CUP).

Isolamento CTC da pazienti CUP con sistema Parsortix

Le cellule tumorali sono state arricchite dal sangue periferico utilizzando il sistema Parsortix (ANGLE plc, Guildford, UK). Le cellule del sangue sono state fatte passare attraverso una cassetta separatrice da 6,5 µm in grado di catturare le CTC in base alle loro dimensioni e proprietà di deformabilità. Quindi, per confermare la natura di CTC delle cellule trattenute, abbiamo colorato le CTC utilizzando una combinazione di anticorpi fluorescenti EpCAM-FITC, CD45-APC (BD 561864/555485) e DAPI per la colorazione dei nuclei delle cellule. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza invertita Leica DMI6000 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania).

Le CTC dal sangue periferico del paziente sono state isolate combinando CELLSEARCH e il sistema DEPArray. Per la paziente Pt#95, CELLSEARCH ha catturato 133 celle CTC da cui DEPArray ha recuperato 34 CTC putative. Un numero totale di 32 CTC e 4 leucociti sono stati

sottoposti ad amplificazione dell'intero genoma di una singola cellula e 10 CTC hanno superato i criteri di controllo di qualità per l'analisi dell'intero genoma passa-basso. Il sangue intero della paziente Pt # 95 è stato utilizzato anche per isolare le CTC con il sistema Parsortix (ANGLE plc). Le cellule grandi sono state isolate con una cassetta Parsortix da 6,5 μm . Alcuni CTC EpCAM-positivi e CD45-negativi sono stati catturati nella cassetta, insieme a cellule EpCAM-positive e CD45-positive di significato sconosciuto (Figura 1).

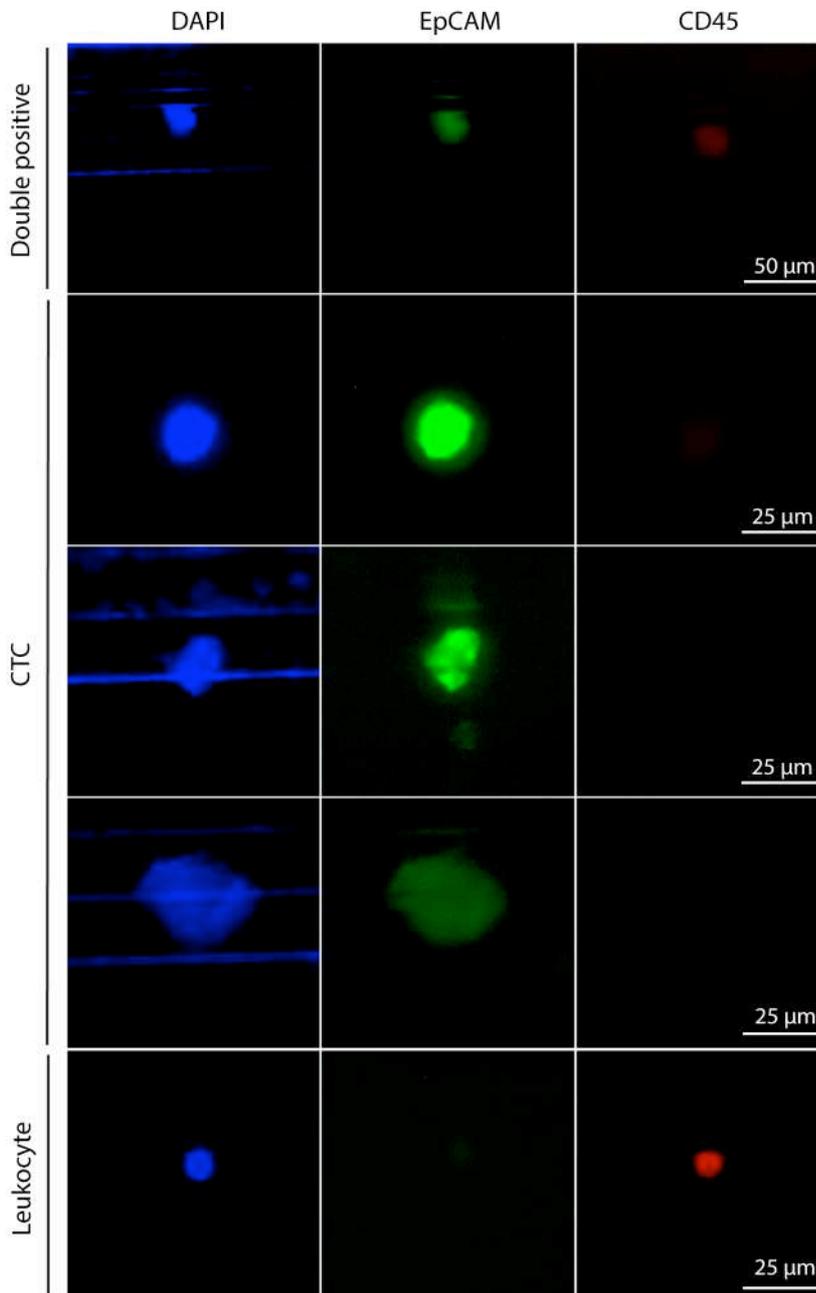


Figura 1. Colorazione di cellule isolate con Parsortix dal paziente CUP#95. Le cellule sono state forzate a passare attraverso la cassetta da 6,5 μm del sistema Parsortix e quindi colorate con diversi anticorpi. Nuclei colorati con DAPI (blu), CD45 (rosso) ed EpCAM (verde). Dall'alto in basso: cellule doppiamente positive (CD45+, EpCAM+) di significato sconosciuto, tre CTC esemplari (CD45-, EpCAM+), un leucocita esemplare (CD45+, EpCAM-) Barra di scala, 50 μm (cellule doppiamente positive), 25 μm (CTC e leucocita).

I risultati ottenuti con il sistema Parsortix sono stati confrontati con la metodologia standard (DEPArray) per la caratterizzazione delle CTC che ha fornito i risultati visibili nella Figura 2, confermando la validità del sistema Parsortix per la quantificazione e marcatura delle CTC.

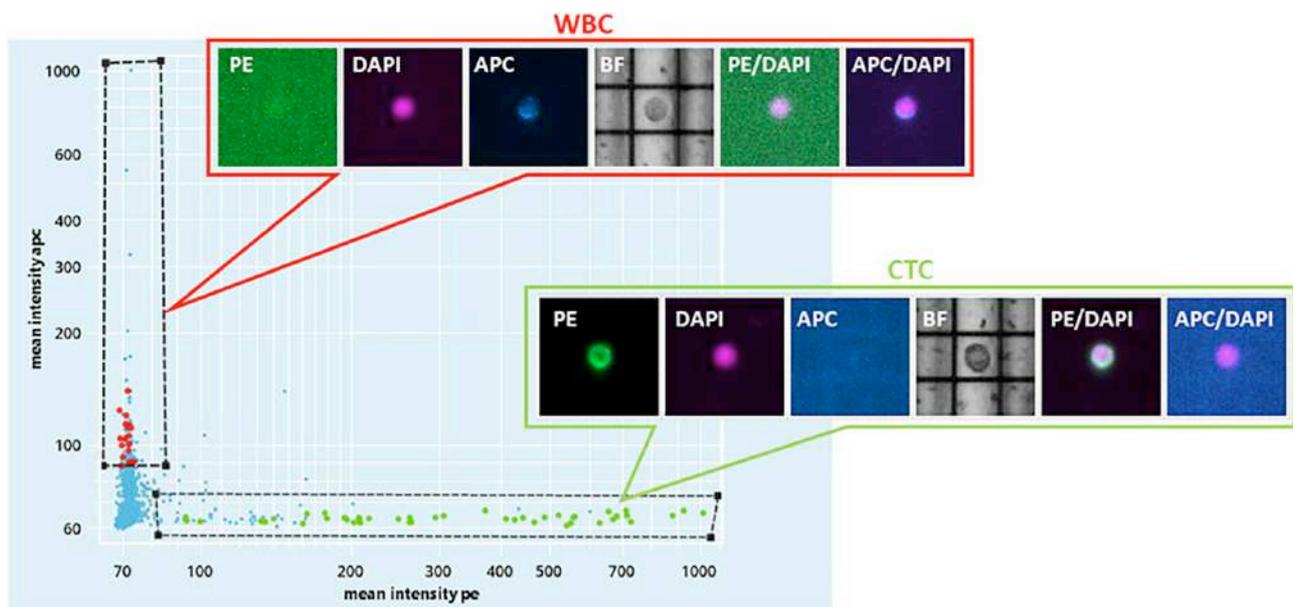


Figura 2. Analisi DEPArray NxT. Grafico di dispersione del campione di sangue arricchito del paziente #95. Sull'asse X è riportata l'intensità media di fluorescenza del canale del fluoroforo PE, corrispondente all'intensità della colorazione delle Citokeratine. Sull'asse Y è rappresentata l'intensità media di CD45 con fluoroforo APC.

I risultati di questo studio sono stati pubblicati sulla rivista *Frontiers in Cell and Developmental Biology*:

Laprovitera N, Salamon I, Gelsomino F, Porcellini E, Riefolo M, Garonzi M, Tononi P, Valente S, Sabbioni S, Fontana F, Manaresi N, D'Errico A, Pantaleo MA, Ardizzoni A, Ferracin M. Front Cell Dev Biol. 2021 Jun 10;9:666156. doi: 10.3389/fcell.2021.666156. eCollection 2021. PMID: 34178989

L'obiettivo di messa in coltura a lungo termine delle cellule vitali isolate con il Parsortix è in fase di realizzazione con risultati promettenti. Nella Figura 3 è possibile osservare alcune immagini di una linea cellulare tumorale derivata da CTC di un paziente CUP dopo isolamento con Parsortix di cellule vitali e loro messa in coltura (dati non pubblicati).

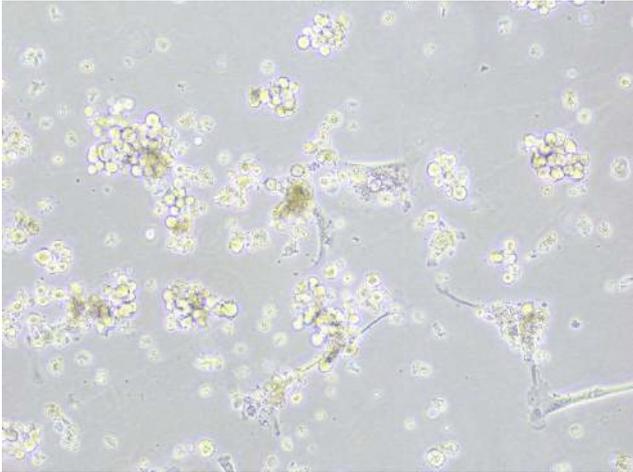


Figura 3. Linea cellulare tumorale sviluppata da CTC.

Obiettivo 2: Isolamento e caratterizzazione di cellule tumorali circolanti come marcatori tumorali precoci

Ad oggi più di 30.000 donne in Italia sono affette da cancro ovarico, malattia che rappresenta la quinta causa di morte delle pazienti oncologiche. Nel 70% dei casi la malattia viene diagnosticata in uno stadio avanzato del tumore, dovuto alla difficoltà di interpretazione dei sintomi, con una conseguente prognosi infausta e sopravvivenza complessiva di 30-40% in 5 anni (8). Inizialmente, le pazienti rispondono bene alla chemioterapia con platino/taxano, ma in 5 anni le recidive compaiono in 75% dei casi. Ad oggi mancano marcatori precoci per questa patologia e non esistono protocolli di screening che permettano l'identificazione precoce.

L'ipotesi del progetto è che il sistema Parsortix possa portare allo sviluppo di protocolli per la diagnosi precoce per il cancro ovarico. L'obiettivo del progetto è sviluppare nuovi approcci diagnostici per la diagnosi precoce delle neoplasie ovariche, non basati su marker oncologici specifici, bensì sulla individuazione di cellule tumorali circolanti (CTC) nei prelievi ematici delle pazienti affette.

Per migliorare la sensibilità del rilevamento delle CTC, è necessaria una fase di arricchimento per concentrare le CTC prima della loro effettiva identificazione. Pertanto, l'efficienza di arricchimento CTC è stata confrontata tra Parsortix e la selezione negativa con anticorpi anti-CD45. I campioni erano costituiti da donatori sani PB (10 ml) addizionati con 0 (controllo negativo), 5, 50 o 500.000 cellule di cancro ovarico (OC) SKOV3. Il rilevamento si è basato sull'identificazione dell'espressione genica specifica dell'OC mediante qRT-PCR. Le CTC sono state rilevate raramente in campioni non arricchiti, confermando che il rilevamento di CTC richiede una fase di arricchimento. Sia il Parsortix che la deplezione di cellule CD45+ hanno permesso di rilevare geni specifici per OC anche in campioni addizionati di sole 5 cellule OC. Parsortix è risultato essere più efficiente, in quanto ha consentito il rilevamento di CTC senza la fase di pre-amplificazione in campioni arricchiti con 50 cellule OC, un fenomeno non osservato quando si utilizza l'ordinamento negativo CD45 (Figura 2).

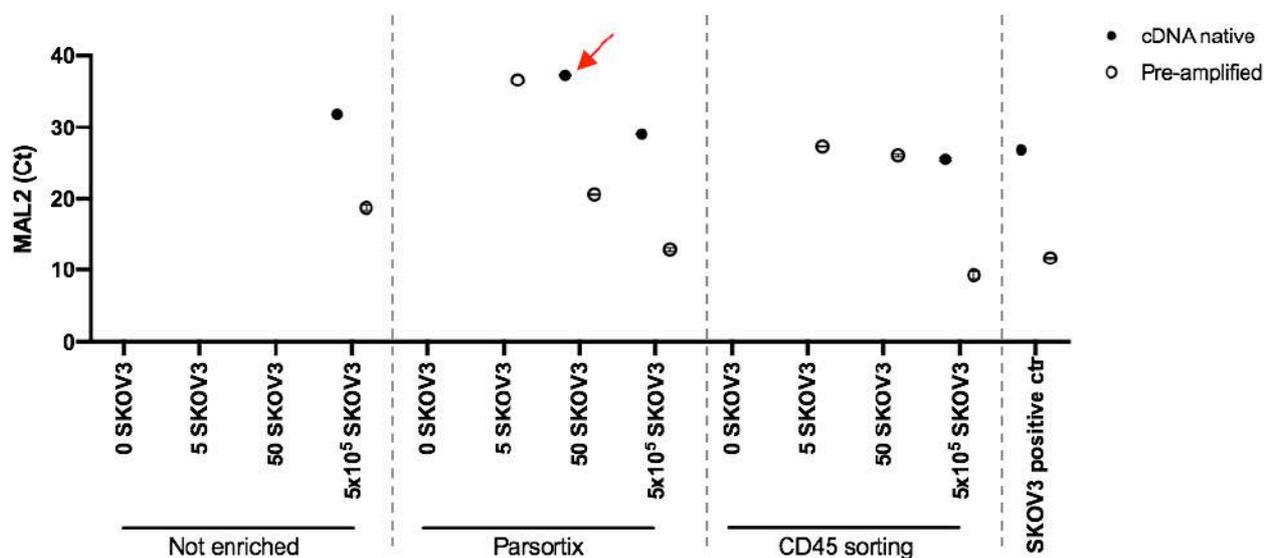


Figura 2. Analisi qRT-PCR che confronta diversi metodi di arricchimento delle CTC attraverso un test basato sull'espressione genica nei tumori ovarici. L'espressione di MAL2 è stata determinata mediante approccio con sonda TaqMan in campioni di PB addizionati con un numero crescente di cellule OC SKOV3. Dopo l'arricchimento delle cellule tumorali, il rilevamento del gene è stato valutato in preparazioni di cDNA canoniche (cDNA nativo - cerchi neri) e cDNA preamplificato (cerchi bianchi). La freccia rossa indica il successo della rilevazione in un campione di cDNA nativo riempito con 50 cellule SKOV3 e arricchito con Parsortix.

I risultati di questo studio sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica:

Current methodologies to detect circulating tumor cells: a focus on ovarian cancer. Lemma S, Perrone AM, De Iaco P, Gasparre G, Kurelac I. Am J Cancer Res. 2021 Sep 15;11(9):4111-4126. eCollection 2021. PMID: 34659879